

**Untersuchung zur Bestimmung
von Humanem Plazentarem Laktogen
mit einem Enzymimmunoassay.
Vergleich mit einem
kommerziellen Radioimmunoassay
im Verlauf normaler Schwangerschaften.**

Brigitte Schneider

1982

Aus der Frauenklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. K. Richter

Untersuchung zur Bestimmung von Humanem Plazentarem Laktogen mit einem Enzymimmunoassay. Vergleich mit einem kommerziellen Radioimmunoassay im Verlauf normaler Schwangerschaften.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität in München

vorgelegt von

Brigitte Schneider

aus

Egling

München 1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. Richter

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.1982



A. Einleitung

Anfang der Siebziger Jahre machte erstmals ein Testverfahren von sich reden, das nach dem Prinzip des seit siebzehn Jahren bekannten Radioimmunoassay (RIA) arbeitet, jedoch Enzyme statt Isotopen zur Markierung von Antigenen oder Antikörpern zum Einsatz bringt. Dieses Verfahren erhielt entsprechend die Bezeichnung Enzymimmunoassay (EIA)

(1, 2, 4, 6, 7, 14, 18)

Mit dem EIA ergab sich wie mit dem RIA die Möglichkeit, Hormone oder diverse Pharmaka in sehr niedriger Konzentration zu bestimmen, wie zum Beispiel Digitalisalkaloide, Betäubungs- und Schlafmittel, Antibiotika, Antikonvulsiva, Zytostatika u.a. Hierbei entwickelte man im Laufe weniger Jahre verschiedene Techniken des EIA: Immunometrischer Assay, Sandwich-Antigenassay, Sandwich-Antikörperassay, um nur einige Beispiele zu nennen.

(5, 8, 9, 14, 15, 16, 17, 18)

In der folgenden Untersuchung beschäftigen wir uns mit der enzymimmunologischen Bestimmung von Humanem Plazentarem Laktogen im Serum schwangerer Frauen. Humanes Plazentares Laktogen (HPL) ist ein Hormon, dessen Existenz und Bedeutung als Funktionsparameter der Plazenta Anfang der Sechziger Jahre entdeckt wurde.

(10, 11, 12, 13, 19)

Als einer der ersten unternahm Barbour den Versuch, einen Enzymimmunoassay zur Bestimmung von HPL zu erarbeiten.

(3)

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem Enzymimmunoassay für HPL experimentiert, wobei es sich um ein Festphasensystem nach dem Sandwichprinzip handelt. Van Hell und Mitarbeiter entwickelten das Testmaterial, die Firma Organon (Oss, Holland) stellte es uns zur Verfügung.

Folgende Fragen sollten untersucht werden:

- Präzision der Methode in Serie und von Serie zu Serie
- Normalwerte für HPL von normal verlaufenden Schwangerschaften ab der 10. Schwangerschaftswoche.
- Vergleich mit einem hinsichtlich seiner Qualität bekannten Radioimmunoassay.
- Beurteilung von Arbeitsaufwand und praktischer Anwendbarkeit im Vergleich zum RIA.

P. Material und Methodik:

I. In den von Organon (Oss, Holland) zur Verfügung gestellten Testkits waren folgende Reagentien enthalten:

- 1.) gefriergetrockneter HPL-Standard (zur Erstellung der Eichkurve für die jeweilige Testserie)
- 2.) HPL-Meerettichperoxidase (dient als Markerenzym)
- 3.) gefriergetrocknetes HPL-Antiserum (aus Kaninchen gewonnen)
- 4.) DASP (R) (=Double-Antibody-Solid-Phase), an Zellulosepartikel absorbiertes Schafantiserum, das gegen Kaninchenserum gerichtet ist.
- 5.) Zellulose (als unlösliche Matrix der Antigen-Antikörper-Komplexe).
- 6.) Orthophenylen-diamin-di-HCL (als Farbstoffspender der spektralphotometrisch meßbaren Reaktion).
- 7.) Magnesiumperoxid
- 8.) Phosphatpufferkonzentrat

6.-8. wurden als Substrat für die Enzymreaktion benötigt. Ferner benötigte man zur Durchführung des Versuchs 0,9%-ige NaCl-Lösung und 4n-Schwefelsäure

II. Verwendete Gerätschaften:

- 1.) Reagenzröhrchen (12ml) aus Glas oder Kunststoff
- 2.) Erlmeyerkolben
- 3.) ein präzise arbeitender Verteiler, gefüllt mit Aqua destillata
- 4.) Eppendorff-Pipetten verschiedener Größe
- 5.) Saugpipetten verschiedener Größe
- 6.) Magnetrührer
- 7.) Zentrifuge (mindestens 3200 U)
- 8.) Spektralphotometer

III. Testmaterial

Insgesamt wurden 310 Seren von schwangeren Frauen auf ihren HPL-Gehalt hin untersucht. Es handelte sich hierbei ausschließlich um normale Schwangerschaften. Im Zeitraum von der 10. bis zur 40. Schwangerschaftswoche wurden pro Woche 10 Seren getestet.

Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Blut zentrifugiert und das Serum bei minus 20°C bis zur Aufarbeitung eingefroren.

IV. Vorbereitung

- Pro Testserum wurden je drei Erlmeyerkolben für die verschiedenen Verdünnungen bereitgestellt und entsprechend beschriftet.
- Für die Verdünnungsreihe des HPL-Standards wurden je 6 Reagenzröhrchen benötigt.

Da jeder Wert jeweils doppelt bestimmt wurde, bestand die entgültige Anzahl an Reagenzröhrchen in:

- 10 Röhrchen für die Verdünnungsreihe des HPL-Standards
- 2 Röhrchen, die als testinterne Kontrolle mitliefen (enthielten weder Testserum noch Antiserum)
- 6 Gläschen, die kein Testserum, wohl aber Antiserum enthielten (zur Erstellung des sogenannten B₀-Wertes).
- 6 Röhrchen für jedes Testserum (es wurden, wie erwähnt, pro Serum drei Verdünnungen hergestellt und diese jeweils doppelt bestimmt)

V. Verdünnung der Testseren:

Bedingt durch die mehrfachen Ansätze, mitlaufenden Standards, Kontrollen und Leerwerte, konnten pro Versuchsreihe maximal fünf Seren auf ihren HPL-Gehalt hin untersucht werden.

Zum Verdünnen verwendete man 0,9%ige NaCl-Lösung.

Bezüglich der Verdünnungsfaktoren ging man nach folgendem Schema vor:

10.-12. Schwangerschaftswoche:	10-fach
13.-14.	" 20-fach
15.-16.	" 40-fach
17.-20.	" 60-fach
21.-24.	" 80-fach
25.-28.	" 100-fach
29.-32.	" 150-fach
33.-36.	" 250-fach
27.-40.	" 300-fach

Gerade in den letzten Wochen der Schwangerschaft wurden bisweilen Verdünnungsfaktoren bis zu 1000 benötigt, damit die photometrisch gemessene Absorption in den Bereich der Eichkurve fiel und somit der HPL-Gehalt berechnet werden konnte.

Um möglichst sicher zu gehen, daß ein Testserum die oben genannte Bedingung erfüllte, wurden von jeder Probe drei Verdünnungen hergestellt:

- diejenige, die erfahrungsgemäß für die betreffende Schwangerschaftswoche ausreichte.
- eine weitere Verdünnung oberhalb dieses Bereiches,
- eine dritte unterhalb dieses Bereiches.

VI. Verdünnung des HPL-Standards:

1. Herstellung der Standard-Lösung:

Ein Fläschchen HPL-Standard (300µg) wurde mit 2,5ml NaCl versetzt, 10 Minuten stehengelassen und dann gut geschüttelt. Die so entstandene Lösung erhielt die Bezeichnung S .
O

2. In jedes der vorher bereitgestellten Reagenzröhrchen pipettierte man 2ml NaCl, danach in das erste dieser .
Gläser 3ml der S -Lösung und erhielt nach Schütteln S¹
O

3. In die Röhrchen 2-6 wurden nach dem Prinzip des "Überpipettierens", je 2ml aus dem vorhergehenden Glas hinzugefügt und jeweils gut geschüttelt.

4. So erhielt man schließlich S -S_{A E}, die zur Erstellung der Eichkurve nötigen Standardverdünnungen, mit folgenden HPL-Konzentrationen:

S : 36,0µg/ml

A
S : 21,6µg/ml

B
S : 13,0µg/ml

C
S : 7,8µg/ml

D
S : 4,6µg/ml

E

5. Nun pipettierte man 0,5ml jeder Standardverdünnung in die bereitgestellten Teströhrchen.

VII. Ansätze für die Kontrolle B_k und die B_o-Werte

In jedem der vorbereiteten Versuchsröhrchen wurden 0,5ml NaCl-Lösung vorgegeben.

VIII. Versuchsablauf (mit HPL als Antigen)

1. Immunreaktion:

- a) Zu einem Fläschchen gefriergetrocknetem HPL-Antiserum wurden 4ml 0,9%ige NaCl-Lösung pipettiert, 10 Minuten gewartet, dann gut geschüttelt.
- b) 100 μ l Antiserum gab man in jedes Standard-B_o - und Serumröhrchen. Nur die B_k-Gläser blieben ohne Antiserum. Danach mußte man den Ständer, in dem die Gläser aufgereiht waren, gut schütteln. Es folgte die erste Inkubationszeit von 30 Minuten Dauer, bei Raumtemperatur und Tageslicht.
- c) Zwischenzeitlich wurde das Meerettichperoxidase-Konjugat in 4ml NaCl gelöst und nach 10 Minuten gründlich geschüttelt.
- d) Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je 100 μ l HPL-Meerettichperoxidase-Konjugat in jedes Röhrchen pipettiert, geschüttelt und 40 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

e) Zusammenfassung des Reaktionsschrittes:

Meerettichperoxidase fungiert als Markerenzym.

Es findet eine kompetitive Reaktion zwischen mit Meerettichperoxidase markiertem HPL einerseits und freiem HPL im Testserum andererseits um das HPL-Antiserum statt. Hierbei hat das freie, nicht markierte HPL die größere Affinität zum Antiserum.

2. Trennung des insgesamt gebundenen von freiem HPL-Antigen

- a) Ein Fläschen DASP (R) (5,5ml) wurde mit 4ml NaCl verdünnt. Diese Lösung mußte auf dem Magnetrührer ständig in Suspension gehalten werden.
- b) Nach Ablauf der 40-minütigen Inkubationszeit wurden in jedes Teströhrchen 0,5ml dieser DASP (R)-Suspension pipettiert, alle Gläser gut geschüttelt und anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert.
- c) Währenddessen löste man ein Fläschen Zellulose in 100ml destilliertem Wasser und hielt es auf dem Magnetrührer ständig in Suspension.
- d) Nach Beendigung der Inkubation wurde in jedes Glas 1ml der Zellulose-Suspension gegeben und wiederum geschüttelt. Im Anschluß daran füllte man mit je 4ml destilliertem Wasser auf.

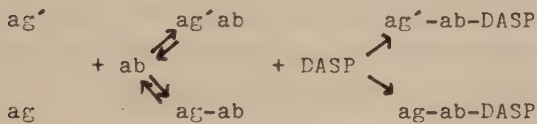
- e) Sodann zentrifugierte man sämtliche Reagenzgläser 5 Minuten lang bei 3200 U.
- f) Daraufhin wurde der Überstand durch schnelles Abgießen verworfen, wobei besonders darauf zu achten war, daß der Bodensatz nicht aufgeschüttelt wurde.
- g) Erst in einem zweiten Waschvorgang schüttelte man den Bodensatz erneut in je 4ml Aqua destillata auf und zentrifugierte nochmals 5 Minuten lang bei 3200 U, wonach der Überstand wieder vorsichtig und zügig abgegossen wurde.
- h) Zusammenfassung dieses Reaktionsschritts:

DASP (=Double-Antibody-Solid-Phase) ist ein "Anti-Anti-Körper" in Festphase, d.h., er reagiert nur mit den aus dem ersten Reaktionsschritt hervorgegangenen Antigen-Antikörper-Komplexen. Somit entstehen nun Antikörper-Antigen-Anti-Antikörperkomplexe. Ungebunden und damit frei schwimmend bleibt nur der Überschuß an enzymmarkiertem HPL-Antigen. Die oben beschriebenen Komplexe hingegen werden an Zellulose als unlösliche Matrix gekoppelt.

In zwei aufeinanderfolgenden Waschvorgängen mit Aqua destillata und anschließendem Zentrifugieren wird nun das freie, nicht an Antikörper gebundene, enzymmarkierte HPL-Antigen durch Abgießen des Überstandes verworfen, in dem es sich befindet.

Zurück bleibt der Komplex aus markiertem bzw. nicht markiertem HPL-Antigen, HPL-Antikörper und DASP (R) (dem gegen die HPL-Antikörper gerichteten Antikörper). Dieser Komplex wird durch Zufügen von Zellulose unlöslich gemacht.

Schematisch kann die Reaktion folgendermaßen dargestellt werden:



ag = HPL

ab = Anti-HPL (aus Kaninchen)

ag[·] = Meerettichperoxidase-markiertes HPL

DASP = Schaafantikörper, der mit den Kaninchenantikörpern reagiert und an Zellulose gekoppelt werden kann.

3. Enzymreaktion

Die für diesen Schritt entscheidende Substratlösung hatte folgende Zusammensetzung:

0,1 mol/l Natriumphosphat-Zitronensäurepuffer +
 0,0002mol/l Orthophenylendiamin-di-HCl + 0,1mol/l
 Magnesiumperoxid.

Die Zubereitung des Substrats sah folgendermaßen aus:

Ein Fläschen (10ml) Pufferlösung wurde mit 90ml destilliertem Wasser verdünnt, eine Kapsel Magnesiumperoxid dazugegeben und schließlich 34mg Orthophenyldiamin-di-HCL darin gelöst.

Da letztere Substanz lichtempfindlich ist, diente zur Aufbewahrung ein dunkles, lichtabweisendes Gefäß. Um die Inhaltsstoffe völlig zur Lösung zu bringen, wurde das Gefäß ca 15 Minuten auf einen Magnetrührer gestellt. Es erwies sich als günstig, mit der Zubereitung der Substratlösung schon während der zweistündigen Inkubationsphase zu beginnen und im Laufe der Zentrifugiergänge fertigzustellen. Auf diese Weise vermied man zu lange Wartezeiten zwischen den Abschnitten des Reaktionsablaufes, die das Ergebnis verfälschen würden.

Im Anschluß an die Waschvorgänge ging man folgendermaßen vor:

- a) In jedes Teströhrchen wurden 2ml der Substratlösung pipettiert.

Dabei war insbesondere auf exakt zeitgleiches Pipettieren zu achten. Mit Hilfe einer Stopuhr kam man dieser Forderung weitestgehend nach. Wie immer, so erfolgte auch nach diesem Vorgang ein gründliches Schütteln sämtlicher Gläser.

- b) Ein letztes Mal wurde 60 Minuten lang bei Zimmertemperatur und im Dunkeln inkubiert.
- c) Nach genau 60 Minuten stoppte man die Reaktion durch Hinzufügen von 0,5ml 4N-Schwefelsäure.
- d) Danach wurden sämtliche Röhrchen nochmals 5 Minuten lang bei 3200 U zentrifugiert.
- e) Abschließend erfolgte die Messung der Enzymaktivität in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 492nm. Gemessen wurde hierbei die Absorption des Überstandes gegen destilliertes Wasser als Leerwert.
- f) Zusammenfassung dieses Reaktionssschrittes:

Nach Zugabe der Substratlösung erfolgt in den Proben eine Farbentwicklung, deren Intensität von der Menge des vorhandenen, an Antikörper gebundenen, enzymmarkierten HPL abhängt.

Dies bedeutet, daß schon die Farbtintensität einen groben Anhalt für die zu erwartende HPL-Konzentration gibt. Weil das Substrat nur mit dem enzymmarkierten HPL-Antigen reagiert, kann eine dunkle Farbe nur dann zustandekommen, wenn der Gehalt an freiem HPL in der Serumprobe gering ist und damit viele Bindungsplätze an den Antikörpern für das markierte HPL freibleiben.

Umgekehrt gilt für eine helle Farbe: wenig markiertes HPL an den Antikörpern und damit ein hoher HPL-Gehalt in der Serumprobe.

Für die gemessene Absorption ergibt sich sinngemäß:
je höher die Absorption (durch größere Farbintensität),
desto geringer die HPL-Menge im Testserum, weil eine hohe Absorption stets an eine große Menge enzymmarkierten HPL-Antigens geknüpft ist und umgekehrt.

(Pipettierschema:) Schematisierter Versuchsablauf

Serumverdünnung (bzw. Standard)

+ HPL-Antiserum

30 min. inkubieren

+ Dasp

2 h inkubieren

+ Cellulose

zentrifugieren

+ Wasser

waschen, zentrifugieren, dekantieren

Pellet

+ Substrat

1 h inkubieren

+ Stopplösung H_2SO_4

zentrifugieren

Messen im Überstand bei 492 nm

C. Auswertung und Ergebnisse

1. Interpretation der gemessenen Absorption der in jedem Test mitgelaufenen Kontrolle B_k :

Da diese Kontrollprobe weder Testserum noch Antiserum enthielt, konnte nach Hinzufügen der Substratlösung auch keine durch markiertes Antigen katalysierte Farbreaktion stattfinden. Denn diese ist an das Vorhandensein von Komplexen aus enzymmarkierten Antigen-Antikörperkomplexen gebunden. Das Ergebnis ist eine sehr niedrige Absorption, bedingt durch das Fehlen der oben beschriebenen Komplexe.

2. Interpretation der gemessenen Absorption in den B_o -Proben:

Diese enthielten kein Testserum, wohl aber Antiserum. Daraus ergibt sich, daß das gesamte enzymmarkierte HPL-Antigen mit den Serumantikörpern reagieren konnte. Somit war die nach Hinzufügen von Substratlösung katalysierte Farbreaktion auch entsprechend intensiv, was in einer hohen Absorption dieser Proben zum Ausdruck kommt.

3. Erstellung der Eichkurve:

- a) Man berechnete das arthmetische Mittel der Doppelbestimmungen jeder Standardverdünnung, ebenso das der sechs Bestimmungen von B_o .

Für jede Standardverdünnung und jede Serumprobe wurde der Wert

$$\frac{B}{O} \times 100\%$$

ermittelt.

B = Enzymaktivität in den Röhrchen, die Probe, Standard oder Kontrolle plus Antikörper und Enzymkonjugat enthalten

$\frac{B}{O}$ = Enzymaktivität in den Röhrchen, die Antikörper und Enzymkonjugat enthalten, jedoch weder Probe, noch Standard, noch Kontrolle.

c) Nun wurden die Werte von $\frac{B}{O} \times 100\%$, die für die Standardverdünnungen errechnet wurden, auf semilogarithmischem Papier gegen den Logarithmus der Standardkonzentration aufgetragen.

Die Eichpunkte waren:

4,6; 7,8; 13,0; 21,6; 36,0 $\mu\text{g/ml}$ HPL

d) Die fünf Meßpunkte wurden durch eine möglichst gerade Linie miteinander verbunden.

4. Ermittlung der HPL-Konzentration in den Testseren:

a) Die Werte von $\frac{B}{O} \times 100\%$ wurden für jede Verdünnung jeder Serumprobe auf diese Standardkurve übertragen und die jeweils korrespondierende HPL-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ abgelesen.

b) Die tatsächlichen HPL-Konzentrationen fand man, indem der abgelesene Wert mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor des Serums multipliziert wurde.

c) Bei korrekter Durchführung des Versuchs mußten die drei Werte für die verschiedenen Verdünnungen eines Testserums weitgehend übereinstimmen.

Somit ermöglicht die mehrfache Verdünnung einer Probe, neben der oben erwähnten Ersparnis von Arbeitsgängen, gleichzeitig eine Kontrolle über die Genauigkeit der Durchführung des Versuchs.

5. Präzision in Serie:

Von einem Serum einer Schwangeren in der 19. Schwangerschaftswoche, der 29. Schwangerschaftswoche und in der 40. Schwangerschaftswoche wurden je 10 Bestimmungen in Serie durchgeführt.

Für das Serum der 19. Schwangerschaftswoche betrug der Variationskoeffizient ($VK = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$) 3,7%, für das Serum der 29. Woche 1,4% und für das der 40. Woche 4,6%.

Tabelle 1:

	Serum 19. SSW	Serum 29.SSW	Serum 40.SSW
Best.Nr. 1	1,1 µg/ml	2,7 µg/ml	5,2 µg/ml
" 2	1,1 "	2,8 "	4,9 "
" 3	1,2 "	2,8 "	5,4 "
" 4	1,2 "	2,9 "	5,1 "
" 5	1,2 "	2,8 "	5,2 "
" 6	1,2 "	2,7 "	5,6 "
" 7	1,1 "	2,7 "	5,6 "
" 8	1,2 "	2,8 "	4,9 "
" 9	1,2 "	2,8 "	5,2 "
" 10	1,2 "	2,8 "	5,1 "
n	10	10	10
x	1,17 µg/ml	2,78 µg/ml	5,22µg/ml
VK	3,7%	1,4%	4,6%

6. Präzision von Serie zu Serie:

Je 1 Serum der 20., 30., und 40. Schwangerschaftswoche wurde in 10 verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt.

Die Variationskoeffizienten betrugen für das Serum der 20. Woche ($VK = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$) 5,4%, das Serum der 30. Woche 5,0% und das der 40. Woche 3,1%.

Tabelle 2:

	Serum 20.SSW	Serum 30.SSW	Serum 40.SSW
Best.Nr. 1	1,5 µg/ml	3,0 µg/ml	5,6 µg/ml
" 2	1,4 "	2,7 "	5,4 "
" 3	1,5 "	3,1 "	5,5 "
" 4	1,5 "	3,0 "	5,4 "
" 5	1,4 "	3,4 "	5,0 "
" 6	1,4 "	3,3 "	5,4 "
" 7	1,5 "	3,4 "	5,3 "
" 8	1,4 "	3,3 "	5,6 "
" 9	1,4 "	3,2 "	5,4 "
" 10	1,5 "	3,3 "	5,1 "
n	10	10	10
x	1,45 µg/ml	3,17 µg/ml	5,37 µg/ml
VK	5,4%	5,0%	3,1%

7. Normalwerte von HPL im Verlauf normaler Schwangerschaften:

Abbildung 1 gibt die Verteilung von HPL-Werten aus 310 Seren von normalen Schwangerschaften zwischen der 10. und 40. Schwangerschaftswoche wieder (10 Seren pro Schwangerschaftswoche).

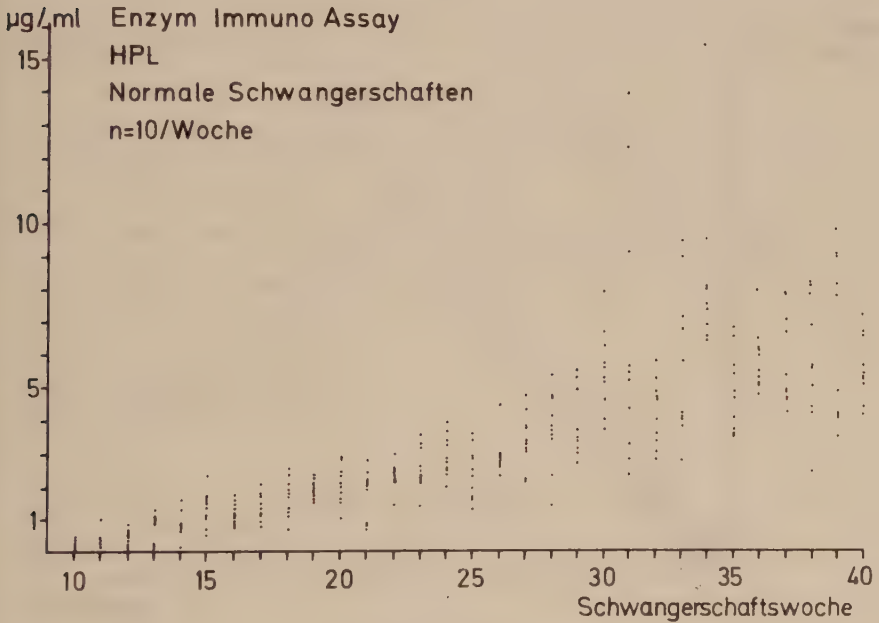


Abb. 1: Verteilung von enzymimmunologisch bestimmten HPL-Werten aus 310 Seren von normalen Schwangerschaften (10 pro Woche)

Abbildung 2 zeigt eine aus 86 Bezugskurven gemittelte Darstellung. Die Bezugskurven wurden mit jeweils fünf Eichpunkten in semilogarithmischer Darstellung erstellt. Die Eichpunkte waren:

4,6; 7,8; 13,0; 21,6; 36,0 ng/ml.

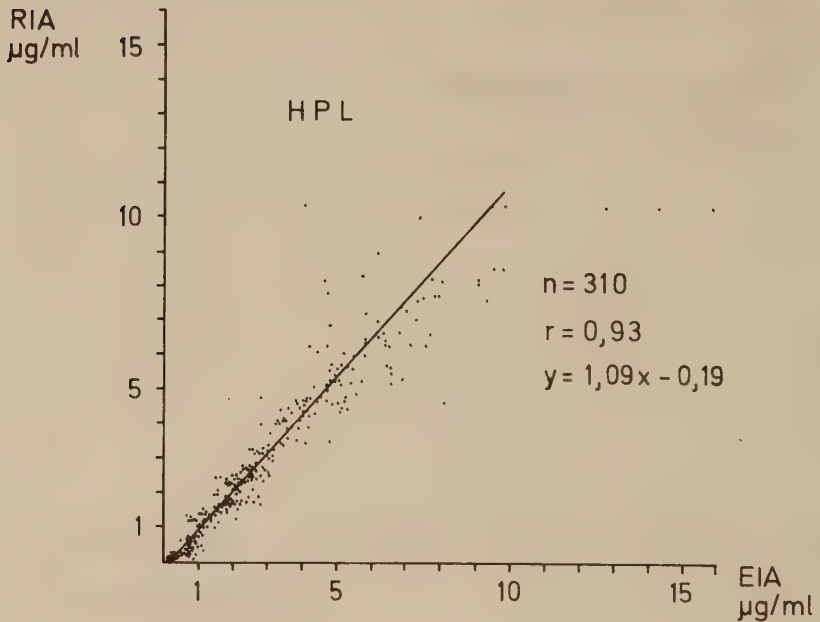


Abb. 2 : Enzymimmunologische Bestimmung von HPL.

Aus 86 Bezugskurven gemittelte Darstellung mit Streubereichen.

8. Korrelation zwischen enzymimmunologisch und radioimmunologisch bestimmten HPL-Werten:

In sämtlichen 310 Serumproben wurde HPL auch radioimmunologisch gemessen. Dazu stand uns ein kommerziell erhältlicher Kit der Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig zur Verfügung. Die Trennung der antikörpergebundenen Komponenten von den ungebundenen erfolgt dabei durch Äthanol-fällung.

Präzision des RIA:

VK in Serie 8,0%, $n = 17$, $\bar{x} = 6,4 \text{ ng/ml}$;

VK von Serie zu Serie 4,9%, $n = 17$, $\bar{x} = 4,9 \text{ ng/ml}$.

Die Korrelation zwischen RIA und EIA ist in Abbildung 3 dargestellt. Sie ist mit $r = 0,93$ sehr eng.

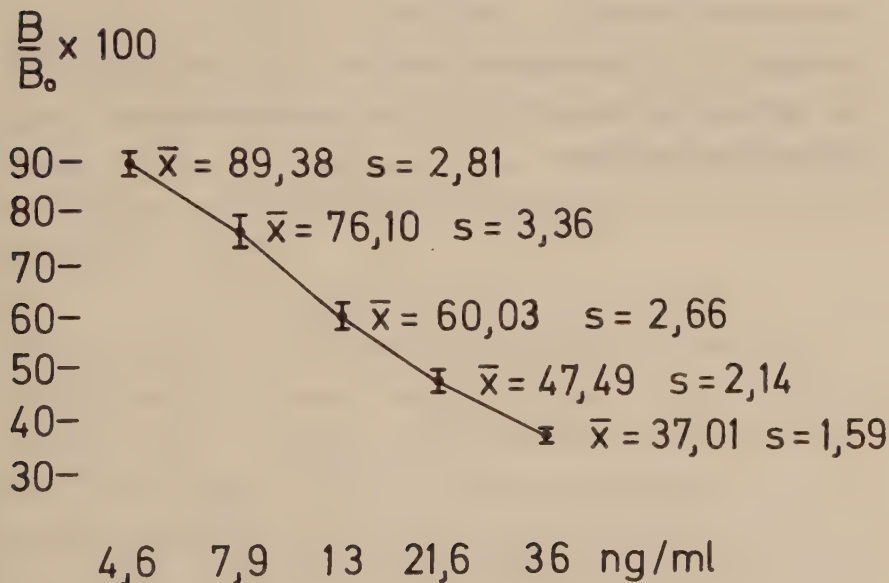


Abb. 3: Korrelation zwischen enzym- und radioimmunologisch bestimmten HPL.

D. Diskussion:

I. Diskussion der Methode:

Wegen der größeren Anzahl von Pipettierschritten ist der Arbeitsaufwand für den EIA vergleichsweise höher als für den RIA. Das Testergebnis liegt jedoch wie bei RIA ebenfalls nach 6 Stunden vor, was enge zeitliche Verlaufskontrollen erlaubt.

Wegen seines geringen technischen Aufwandes und der niedrigen Gerätekosten ist der EIA in jedem kleineren Labor mit der gängigen Grundausstattung durchführbar.

Der wesentliche Vorteil des EIA ist die Unabhängigkeit von radioaktiven Substanzen. Somit entfallen auch die Auflagen bezüglich der Strahlenschutzpflicht für die Beschäftigten und das immer größer werdende Problem der Abfallbeseitigung radioaktiver Substanzen.

II. Diskussion der Ergebnisse:

Die HPL-Werte, die durch enzymimmunologische Bestimmung ermittelt wurden, zeigten die Genauigkeit und Spezifität der Methode auf. Als Parameter hierfür bezog man sich auf die Präzision in Serie und von Serie zu Serie. Die Variationskoeffizienten waren dabei niedrig, nämlich für die Präzision in Serie für ein Serum der 19. Schwangerschaftswoche 3,7%, für ein Serum der 29. Schwangerschaftswoche 1,4% und für das der 40. Woche 4,6%. In der Präzision von Serie zu Serie fand man einen Variationskoeffizienten von 5,4% für das Serum der 20. Schwangerschaftswoche, 5,0% für eines der 30. Schwangerschaftswoche und 3,1% für ein Serum der 40. Schwangerschaftswoche.

Bei einem Vergleich mit früher durchgeführten Arbeiten zur Erstellung der Normalwerte von HPL im Serum schwangerer Frauen mittels RIA konnte man feststellen, daß Größenordnung, Verlauf und Streubereich der HPL-Werte im Wesentlichen übereinstimmen. (20, 21, 22)

Bestätigt wurde dies in unserem Versuch durch die parallel durchgeführte radioimmunologische Bestimmung des HPL in sämtlichen Testseren. Die Präzision in Serie und von Serie zu Serie lagen in der gleichen Größenordnung, wobei der Variationskoeffizient bei ersterer 8,0% betrug, bei letzterer 4,9%. Der Korrelationskoeffizient zwischen EIA und RIA war mit $r = 0,93$ sehr eng.

Schwierigkeiten bereitete lediglich die Wahl der richtigen Verdünnung von Seren der höheren Schwangerschaftswochen.

In diesem Bereich waren bisweilen Verdünnungen von 1:1200 notwendig, da der Meßbereich der Eichkurve relativ eng ist und die Meßdaten bei niedrigerer Verdünnung aus diesem Bereich herausgefallen wären. Deshalb waren häufig über die drei üblichen Verdünnungen hinaus mehrfache Ansätze nötig, um die richtige Verdünnung des betreffenden Serums zu finden.

E. Zusammenfassung:

Ein neuer Enzymimmunoassay (EIA) zur Bestimmung von Humanem Plazentarem Laktogen (HPL) wurde im Hinblick auf seine Praktikabilität und Qualität untersucht.

Das Testmaterial wurde von Van Hell und Mitarbeitern der Firma Organon (Oss, Holland) entwickelt und uns zur Verfügung gestellt.

Die Präzision des Systems in Serie wurde mit je einem Serum der 19., der 29. und der 40. Schwangerschaftswoche überprüft. Der Variationskoeffizient betrug für das Serum der 19. Woche 3,7%, das der 29. Woche 1,4% und das der 40. Woche 4,6% (jeweils $n = 10$).

Die Variationskoeffizienten der Präzision von Serie zu Serie betrugen für ein Serum der 20. Schwangerschaftswoche 5,4%, eines der 30. Woche 5,0% und eines der 40. Woche 3,1% (jeweils $n = 10$).

Aus 310 Seren von normal verlaufenden Schwangerschaften wurde eine Normalbereichskurve zwischen der 10. und 40. Schwangerschaftswoche (10 Seren pro Schwangerschaftswoche) erstellt, die sich praktisch mit bekannten RIA-bestimmten Kurven deckte.

Bei Vergleich mit einem routinemäßig angewendeten und hinsichtlich seiner Qualitätskriterien bekannten Radioimmunoassay für HPL ergab sich mit $r = 0,93$ eine enge Korrelation der gefundenen Werte.

Das System war leicht zu handhaben, aber etwas arbeitsaufwendiger als das verglichene RIA-System. Von Vorteil ist jedoch, daß auf alle Geräte und Maßnahmen, die zum Umgang mit Isotopen notwendig sind, verzichtet werden kann.

Schwierigkeiten ergaben sich lediglich bei der Wahl der richtigen Serumverdünnung in den höheren Schwangerschaftswochen, da der Meßbereich der Standardkurve relativ eng ist, sodaß öfters mehrfache Testansätze erforderlich waren.

F. Literatur

1. Maeckel, R., Oellerich, M.:
Enzymimmuntests für die Routinediagnostik
Lab.med. 1, 121-131 (1977)
2. Schuurs, A.H.W.M., van Weemen, B.K.:
Enzyme-Immunoassay
Clinica Chimica Acta, 81, 1-40 (1977)
3. Barbour, H.M.:
Development of an Enzyme-Immunoassay for Human Placental
Lactogen using labelled Antibodies.
Journal of Immunological Methods, 11, 15-23 (1976)
4. Engvall, E., Perlmann, P.:
Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Elisa
The Journal of Immunology, 109, 129-135 (1972)
5. Van Weemen, B.K., Schuurs, A.H.W.M.:
Immunoassay using Hapten-Enzyme Conjugates
FEBS Letters, Vol. 24, 1, 77-81 (1972)
6. Van Weemen, B.K., Schuurs, A.H.W.M.:
Immunoassay using Antibody-Enzyme Conjugates
FEBS Letters, Vol. 43, 2, 215-217 (1974)

7. Van Weemen, B.K., Schuurs, A.H.W.M.:
Immunoassay using Antigen-Enzyme Conjugates
FEBS Letters, Vol. 15, 3, 232-235 (1971)
8. Engvall, E., Jonsson, K., Perlmann, P.:
Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Quantitative Assay of Protein Antigen, Immunoglobulin G by means
of Enzyme-labelled Antigen and Antibody coated tubes
Biochimica et Biophysica Acta, 251, 427-434 (1971)
9. Clamp, J.R., Hughes, K.W., McPherson, J.C.:
Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
Quantitative Assay of Immunoglobulin G
Immunochemistry, 8, 871-874 (1971)
10. Keller, P.J., Gerber, C.:
Die hormonale Früherkennung der fetalen Gefährdung in der
Schwangerschaft
Geburtshilfe und Frauenheilk., 31, 973-979 (1971)
11. Spona, J., Janisch, H.:
Diagnose der Plazentainsuffizienz durch radioimmunologische
Untersuchungen des Serum-HCG und Serum-HPL
Wiener klinische Wochenschrift, 84, 385-389 (1972)
12. Niven, P.R.A., Landon, J., Chard, T.:
Placental Lactogen Levels as Guide to Outcome of Threatened
Abortion
British Medical Journal, 3, 799-801 (1972)

13. Friesen, H.G.:

Biosynthesis of Placental Proteins and Placental Lactogen
Endocrinology, 83, 744-753 (1968)

14. Vogt, W.:

Enzymimmunoassay, Grundlagen und praktische Anwendung
1978

15. Rosenthal, A.F., Vargas, M.G., Klass, C.S.:

Evaluation of Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique (EMIT)
for Determination of Serum Digoxin
Clinical Chemistry, 22, 1899-1902 (1976)

16. Broughton, A., Ross, D.L.:

Drug screening by Enzymatic Immunoassay with the Centrifugal
Analyser
Clinical Chemistry, 21, 186 (1975)

17. Strasser, B., Zinterhofen, L.:

Rapid Enzyme Immunoassay of Phenobarbital and Dilantin on a
Centrifugal fast Analyser
Clinical Chemistry, 21, 946 (1975)

18. Rubenstein, K.E., Schneider, R.S., Ullmann, E.F.:

Homogeneous Enzyme Immunoassay, a new Immunochemical Method
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 846 (1972)

19. William, N., Spellacy, M.D., Karen, L., Carlson, B.S.,
Sharon, A., Firk, E.S.:
Dynamics of human Placental Lactogen
Am.J.Obst.and Gynec., 96, 1164-1173 (1966)
20. Singer, W., Desjardins, P., Friesen, H.G.:
Human Placental Lactogen, an Index of Placental Function
Obetetrics and Gynecology, 36, 222-232 (1970)
21. Badri, N., Saxena, M.D., Kendall, E., Selenkow, H.A.:
Serum Placental Lactogen (HPL) Levels as an Index of Placental
Function
New England Journal of Medicine, 281, 225-231 (1969)
22. Spona, J., Janisch, H.:
Serum Placental Lactogen as Index of Placental Function
Acta Endocrinologica, 68, 401-412 (1971)

DANKSAGUNG

Herrn Prof.Dr.med.K.Richter danke ich für die Möglichkeit, an seiner Klinik meine Doktorarbeit durchführen zu dürfen.

Herrn Priv.Doiz.Dr.med.Leis meinen Dank für die Stellung des Themas sowie für die nicht selbstverständliche Bereitschaft, zu jeder Zeit für meine Probleme und Fragen ansprechbar gewesen zu sein.

Ein ganz herzliches Dankeschön an Frau Alai Keller, durch deren große Hilfsbereitschaft und freundschaftliches Entgegenkommen mir insbesondere das experimentelle Arbeiten sehr erleichtert wurde und mir viel Freude bereitet hat.

LEBENS LAUF

Ich, Brigitte Schneider, wurde am 22.9.53 als zweites Kind des Berufsoffiziers Bruno Schneider und seiner Frau Rosemarie in Egling geboren.

1960-64: Besuch der Volksschule in Egling

1964-73: Schülerin am Gymnasium Bad Tölz bis zum Abitur

1973-80: Medizinstudium an der Ludwig-Maximilian-Universität in München.

30.4.80: Approbation als Ärztin

1.6.80 - 31.5.81: Assistentin an der Chirurgischen Klinik,
Klinikum Großhadern (Direktor: Prof.Dr.med.G.Heberer)

ab 1.6.81: Assistentin an der I.Med.Klinik, Klinikum Großhadern
(Direktor: Prof.Dr.med.G.Riecker).

